EMS 诱导红阳猕猴桃耐寒突变体的筛选及转录组分析

杨娜，叶琴霞，魏卓，张汉尧*

（西南林业大学西南山区森林资源保护与利用教育部重点实验室，昆明 650224）

摘 要：红阳猕猴桃（*Actinidia chinensis* var. *chinensis* ‘Hongyang’）具有较高的经济价值、营养价值，以及较好的市场开发前景。但近年红阳猕猴桃产区如云南、四川等多地多次遭遇倒春寒等极限天气，其抗寒性差的特点限制了其发展空间。该研究通过在组培的过程中使用甲基磺酸乙酯(EMS)诱导红阳猕猴桃突变体，进而筛选出耐寒突变体，并通过转录组分析探究其胁迫响应机制。该研究以红阳猕猴桃叶片为实验材料，在组培时（4.4 g·L^{-1} MS+4.5 g·L^{-1} 琼脂+1.5 mg·L^{-1} 6-BA+0.1 mg·L^{-1} NAA+15 g·L^{-1} 蔗糖+0.01~0.1 g·L^{-1} EMS）利用 EMS 诱导技术诱导突变体，并在低温环境下筛选出耐寒突变体。选出的耐寒突变体和正常红阳猕猴桃组培苗进行 4 ºC 12 h 寒胁迫处理，而后，进行转录组测序分析。结果表明：（1）通过初步的表型鉴定，当 EMS 处理浓度为 0.06 g·L^{-1} 时诱导的部分突变体具有一定的耐寒性；（2）在转录组测序数据 GO 功能富集分析中，富集条目最多的类目是生物学过程部分;（3)利用 KEGG 数据库分析时，共筛选到 21 条差异基因在 15 条通路中得到注释，且均为上调表达，其中内质网中的蛋白质加工通路（ath04141）中富集的差异基因最多，且该通路内的 *sHSF*、*Hsp*70 和 *NEF* 可能与耐寒机制调控有关。以上研究结果将为红阳猕猴桃耐寒种质资源的研究与利用提供材料基础及理论依据。

关键词：猕猴桃，EMS，耐寒突变体，转录组，热激蛋白

中图分类号：Q943　　　　　　　　　　　**文献标识码：**A

Screening and transcriptome analysis of EMS-induced cold-tolerant mutants in Hongyang kiwifruit

YANG Na, YE Qinxia, WEI Zhuo, ZHANG Hanyao*

(*Key Laboratory of Forest Resources Conservation and Utilization of the Ministry of Education in Southwest China*, *Southwest Forestry University*, Kunming 650224, China）

Abstract: The Hongyang kiwifruit *(Actinidia chinensis* var. *chinensis* ‘Hongyang’) has a high economic and nutritional value and good prospects for market development. However, in recent years Hongyang kiwifruit production areas such as Yunnan and Sichuan have been subjected to extreme weather such as inversions on several occasions, and its poor cold resistance has limited its scope for development. In this study, ethylmethane sulfonate (EMS) was used to induce mutants of Hongyang kiwifruit in a tissue culture process, which led to the screening of cold-tolerant mutants and the investigation of their stress response mechanisms through transcriptome analysis. In this study, mutants were induced using EMS induction technology using Hongyang kiwifruit leaves as experimental material in tissue culture (4.4 g·L^{-1} MS + 4.5 g·L^{-1} agar + 1.5 mg·L^{-1} 6-BA + 0.1 mg·L^{-1} NAA + 15g·L^{-1} sucrose + 0.01-0.1 g·L^{-1} EMS) and screened for

基金项目：国家自然科学基金（32160556）[Supported by National Natural Science Foundation of China（32160556）]。

第一作者：杨娜(1999 -)，硕士研究生，主要从事遗传育种研究，（E-mail）yangna1999@swfu.edu.cn。

***通信作者：**张汉尧，教授，博士生导师，从事植物和微生物分子遗传研究，（E-mail）zhanghanyao@swfu.edu.cn。

cold-tolerant mutants under low temperature. Selected cold-tolerant mutants and normal Hongyang kiwifruit tissue culture seedlings were subjected to 4 °C 12 h cold stress treatment, while later, transcriptome sequencing analysis was performed. The results were as followed: (1) Some of the mutants induced by the 0.06 $g \cdot L^{-1}$ EMS were phenotypically resistant to cold; (2) In the GO functional enrichment analysis of transcriptome sequencing data, the most enriched entries were in the biological processes; (3) The protein processing pathway (ath04141) in the endoplasmic reticulum was the most enriched, and *sHSF*, *Hsp*70, and *NEF* in this pathway may be related to the regulation of cold tolerance mechanisms. The above findings will provide a material basis and theoretical rationale for the research and utilization of cold-tolerant germplasm resources of Hongyang kiwifruit.

Key words: kiwifruit, EMS, cold-tolerant mutant, transcriptome, heat shock protein

红阳猕猴桃（*Actinidia chinensis* var. *chinensis* ‘Hongyang’）果心呈血红色放射状，味甜可口，含有较高的维生素 C、维生素 E、多种游离氨基酸及矿物质成分，更含有独特的花青素，是兼具保健及美容功能于一体的重要经济作物（张维等，2021）。红阳猕猴桃属于早熟型品种，对低温尤为敏感（马秋诗，2014）。红阳猕猴桃对种植区环境要求较高，需要达到夏季无酷暑、冬季无严寒（黄永红等，2016）。南方多省市近年日降温幅度都超过 10 ℃，不断刷新历史气温最低值，这些气候变化导致温度骤降，对猕猴桃产业产生一定影响，严重情况时导致猕猴桃树体直接冻死（李化龙等，2021）。随着红阳猕猴桃生产的迅速发展和种植面积的不断扩大，气候的异常变化严重制约其发展，低温胁迫成为影响其生长、果实质量和产量的主要因素之一。因此，培育出耐寒性强的红阳猕猴桃种质资源已成为生产中的重要研究内容之一。

近年来，耐寒诱变育种已经被广泛运用于各个植物遗传育种中的抗寒品种选育中，技术也趋于成熟（陈祥韦，2017）。其中甲基磺酸乙酯（ethylmethyl sulfonate, EMS）是目前世界上公认最有效的用于抗性品种选育的化学诱变剂之一，其具有使用方便、特殊性较好、诱变所产生的后代遗传性状比其他诱变育种的后代更稳定等优点（王元东等，1999；彭波等，2007）。王小华等（2010）对柱花草愈伤组织进行化学诱变处理，并通过筛选抗寒突变体选育出优良种质资源。陈祥韦（2017）利用 EMS 诱变技术处理海雀稗愈伤组织，并对再生植株进行耐寒性鉴定，进而筛选出耐寒材料获得海雀稗耐寒突变体。曹冠男（2018）筛选出 EMS 诱变小麦的最适处理组合，在所构建的突变群体中筛选出丰富的表型变异。孙慧（2019）以海滨木槿为材料，利用不同浓度 EMS 进行诱变处理，选择合适的诱变浓度和时间，通过对后期幼苗变异表型的观察、生理指标的测定以及亚显微结构的比较进行抗寒性的筛选与鉴定，获得了海滨木槿抗寒新品种。胡松梅等（2019）在设置 0 ℃ 的光照培养箱中培养经 EMS 诱导后的铁皮石斛突变体，筛选出 20 株耐寒能力较高的突变体。

植物转录组学研究是基于 RNA 水平对某一特定植物器官或组织在某种特定条件下进行其细胞内发生的基因转录、转录后调控、调控后表达的研究，是目前研究基因组水平变化最直接和最常用的方式（崔凯等，2019）。周鹤莹（2020）利用冬枣和金丝小枣冷冻胁迫的转录组数据分析差异表达基因，揭示了 *ZjDREB*1 和 *ZjSOD*1 在提高枣抗冻过程中的作用。杨宁等（2020）利用 EMS 诱导技术与转录组测序技术相结合，也对矮化性状及其调控的相关基因进行了一系列分析。如今，RNA 测序方法已成为分子生物学研究植物抗性功能的重要手段，达到商业化并广泛应用于我国相关农林业的研究中，但采用 EMS 诱导技术与转录组测序技术相结合运用到猕猴桃中还鲜有报道。

红阳猕猴桃营养丰富，经济价值高，但抗寒性差限制了其发展空间，因此通过 EMS 诱变及筛选，选育出红阳猕猴桃耐寒种质资源，有利于红阳猕猴桃种植产业的发展。由于中华

猕猴桃基因组序列已公布，使得红阳猕猴桃耐寒生物学深入研究成为可能。基于已知基因组序列基础上的转录组测序，在基因的挖掘及表达调控方面具有强大的功能，也是研究猕猴桃生长发育及优良性状形成过程中相关基因科学高效的方法。为解决当前红阳猕猴桃抗寒性差，及相关抗寒相关机理不清的问题，该研究拟在组织培养过程中的低温环境下筛选出红阳耐寒突变体并进行转录组水平分析，为红心猕猴桃优良种质资源选育及耐寒机理研究提供了科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

该研究采用西南林业大学温室大棚种植的红阳猕猴桃植株健康叶片为实验材料。

1.2 实验方法

1.2.1 组织培养体系建立

按照师万源等（2021）的方法取红阳猕猴桃幼嫩叶片作为外植体，经流水冲洗 30 min，于超净工作台内用 75% C_2H_5OH 消毒 20 s，再用 0.1 % $HgCl_2$ 溶液消毒 5 min。叶片切成约 1 cm×1 cm 的大小放到 4.4 g·L^{-1} MS + 4.5 g·L^{-1} 琼脂 + 15 g·L^{-1} 蔗糖 + 2.0 mg·L^{-1} TDZ + 0.5 g·L^{-1} IBA 培养基中培养诱导愈伤组织，每瓶放置 3~4 片切好的叶片。待愈伤组织诱导分化不定芽时培养基更换为 4.4 g·L^{-1} MS + 4.5 g·L^{-1} 琼脂 + 15 g·L^{-1} 蔗糖 + 0.3 mg·L^{-1} NAA + 3.0 mg·L^{-1} 6-BA。

1.2.2 EMS 诱导与筛选体系建立

突变体诱导时将 EMS 溶液经 0.22 μm 的过滤器抽滤灭菌，过滤灭菌后将 EMS 加入高温灭菌后的培养基（4.4 g·L^{-1} MS+4.5 g·L^{-1} 琼脂+1.5 mg·L^{-1}6-BA+0.1 mg·L^{-1} NAA+15 g·L^{-1} 蔗糖）中，EMS 培养基配制成 0.01~0.10 g·L^{-1} 诱变浓度，并以不含 EMS 的培养基为对照组。每个处理分别接种 45 瓶，接种后将全部培养瓶放置于光照强度 2 000 lx，培养温度(26 ± 1) ºC，日照 15 h 的培养室内，观察并记录统计外植体存活率，以及筛选出 50 %半致死剂量（LD50）。最后将 EMS 诱变的红阳猕猴桃植株与未经诱变植株放在 4 ºC 冰箱中处理 12 h，取出后开始观察其生长状况及进行形态鉴定，初步筛选出耐寒突变植株。

1.3 转录组测序

设置对照组 A_1、A_2、A_3 3 瓶正常红阳猕猴桃植株组培苗和实验组 B_1、B_2、B_3 3 瓶红阳猕猴桃耐寒突变植株组培苗经过 4 ºC 下 12 h 寒胁迫处理，对其进行取样并用锡箔纸包装并标号，将 6 个样品寄达陕西博瑞德公司进行转录组测序分析。

1.3.1 测序数据处理

根据实验材料的基因信息和参考基因组，按照过滤标准去过滤原始转录组数据中的低质量序列（质量≤ 20 的碱基数占整个 Read 的 50 %以上的低质量 Reads）、杂质和接头。

1.3.2 参考基因组序列对比

将 RNA- Seq 测序所得 Clean reads 与其参考基因组序列进行序列对比，得到 Reads 定位信息。通过对比可以得到测序数据利用率及测序样品与参考基因组亲缘关系的远近。

1.3.3 基因表达量分析及差异表达基因检测

通过 bowtie2 工具将获得 Clean reads 与参考转录组序列进行对比，并统计基因对比率。使用 RSME 对对比结果进行分析统计，获得每个样注释到参考转录组序列 Reads 数目，并计算其 FPKM 值，计算 Fragment 统计转录并通过 FDR 检验差异基因 *P* value 数值，并检验校正 *P* value 阈值。差异检验的 FDR 值越小，其差异倍数越大，所表达差异越显著。

1.3.4 差异表达基因的 GO 功能富集分析

Gene Ontology 富集分析按照国际标准分类分为三大类，包括生物学过程、细胞组分和分子功能三部分。把差异基因注释到 GO 数据库中，将 FDR 值≤0.05 的差异基因作为显著富集的基因本位条目。

1.3.5 差异表达基因 KEGG 富集分析

KEGG（Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes）是有关于 Pathway 的公共基因库，其全称为京都基因与基因组数据库，KEGG 主要包括 KEGG Pathway、KEGG 基因、KEGG 基因组、KEGG 反应过程等分类。Pathway 富集分析是以 KEGG 途径为单位，将差异基因进行注释分类，并运用超几何检验，使用 R 语言进行富集分析及 *P* value 矫正。

1.4 数据处理

生理指标数据采用 Excel 2003 软件进行数据比较分析，差异基因表达量使用 SPSS 22.0 软件进行显著性检验(P<0.05)。

2 结果分析

2.1 EMS 诱导体系

2.1.1 不同 EMS 处理对红阳猕猴桃愈伤组织死亡率的影响

红阳猕猴桃叶片经愈伤组织诱导后，对其进行不同浓度 10 个梯度 EMS 培养，并设置未添加 EMS 培养基作为对照组。由表 1 可知，EMS 对红阳猕猴桃生长的抑制作用随 EMS 浓度增加而增强。当 EMS 浓度为 0.06 $g·L^{-1}$ 时，死亡率为 51.1 %，与 50 %半致死率最为接近，作为 LD50 进行下一步诱变试验。

表 1 EMS 诱导对红阳猕猴桃外植体死亡率影响

Table 1 Effects of the EMS induction on the mortality of Hongyang kiwifruit explants

EMS 浓度 Concentration of EMS（$g·L^{-1}$）	处理总数（瓶） Number of processing (bottle)	死亡数（瓶） Number of death (bottle)	死亡率 Death rate (%)
0.00 (CK)	45	0	0
0.01	45	4	8.9
0.02	45	6	13.3
0.03	45	10	22.2
0.04	45	17	37.8
0.05	45	19	42.2
0.06	45	23	51.1
0.07	45	26	57.8
0.08	45	31	68.9
0.09	45	37	82.2
0.10	45	40	88.9

2.1.2 突变结果分析

红阳猕猴桃叶部的突变：将 EMS 共培养后存活的红阳猕猴桃愈伤组织培养 30 d，选取不同类型的突变性状进行统计。在叶片中观察到，与 CK（图 1：A）相比，突变类型有叶形、叶柄、叶色、叶缘和被毛共五种突变，见图 1。

红阳猕猴桃株形突变：经 EMS 处理后的红阳猕猴桃的生长能力与对照组相比较弱，表现在株高较矮、叶片发黄等方面。EMS 红阳猕猴桃株型突变主要有株高变矮突变、株型稀疏突变、株型紧凑突变和株型松散突变，见图 2。株高变矮突变植物生长过程较缓慢，叶片颜色较正常植株叶片颜色绿（图 2：J）；株型稀疏突变植株株型较为松散，叶片数量有所减少（图 2：K，M）；株型紧凑突变植株叶片呈包裹状，无法伸展开来，叶片数量较多（图 2：L）。

2.1.3 红阳猕猴桃耐寒突变体筛选及鉴定

将 3 瓶 EMS 诱变的红阳猕猴桃植株与 3 瓶未经诱变植株放在 4 ºC 冰箱中处理 12 h 后取出。培养 7 d 时，发现红阳猕猴桃突变体叶片与对照组叶片相比，红阳猕猴桃突变体叶片仍能保持绿色，对照组叶片边缘部分出现褐化现象，见图 3：N。

经 15 d 后，3 瓶 EMS 诱变的红阳猕猴桃植株（表 2 序号 1、2、3）叶片有部分复绿，有新芽长出，而未经诱变处理植株（表 2 序号 4、5、6）枯萎死亡，无新芽长出，见图 3：O 和表 2，由此可推测出经 EMS 诱变的部分红阳猕猴桃植株获得了一定的耐寒性。

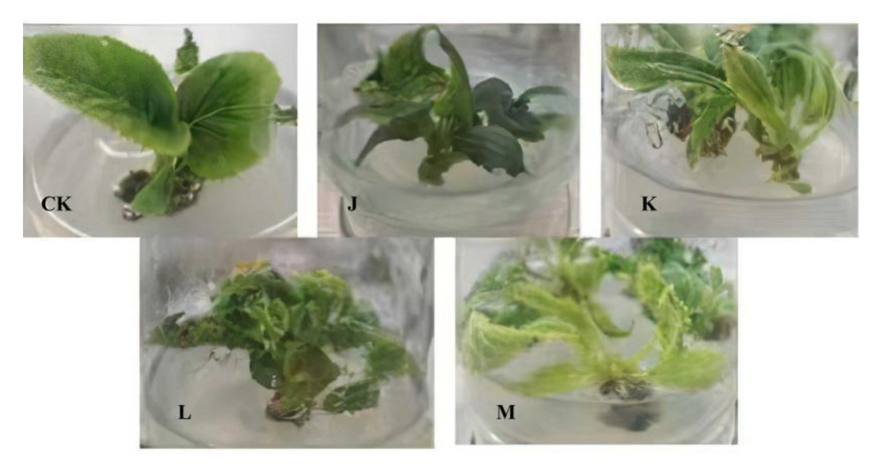


A. 正常叶（CK），心形；**B**. 叶柄叶脉粗大，叶片加厚，呈圆形；**C**. 叶片黄化卷曲，叶柄加粗；**D**. 叶片黄化，叶柄加长，叶缘重锯齿；**E**. 主脉加粗，基本无侧脉；**F**. 叶片针型羽状裂；**G**. 叶脉加长，叶片长卵形；**H**. 叶片细长，光滑无毛；**I**. 叶基偏斜，叶片矩圆形。

A. Normal leaf (CK), heart-shaped; **B**. Thick petiole veins, thickened leaves, circular; **C**. Yellowing and crimping leaves with thick petioles; **D**. Leaf yellow, petiole lengthened, leaf margin double serrate; **E**. The main veins are thick, basically without lateral veins; **F**. Leaf blade needle-shaped pinnate; **G**. Elongated veins, long ovate leaves; **H**. Leaves slender, smooth and hairless; **I**. The blade base is slanted and the blade is round.

图 1 红阳猕猴桃叶片和叶柄突变

Fig. 1 Leaf and petiole mutation of Hongyang kiwifruit

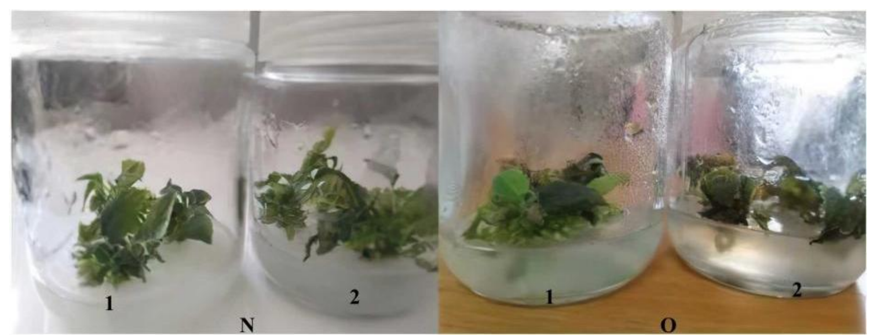


CK. 正常植株；**J**. 株高变矮突变；**K**. 株型稀疏突变；**L**. 株型紧凑突变；**M**. 株型松散突变。

CK. Normal plant; **J**. Dwarf mutation; **K**. Sparse mutation; **L**. Compact mutation; **M**. Loose mutation.

图 2 红阳猕猴桃株型突变

Fig. 2 Strain mutation of Hongyang kiwifruit



N. 在 4 ºC 冰箱中处理 12 h；**O**. 寒胁迫后培养 15 d；**1**. 经 EMS 诱变的红阳猕猴桃植株；**2**. 正常植株。

N. 12 h treatment in a refrigerator at 4 ºC; **O**. 15 days of incubation after cold stress; **1**. Hongyang kiwifruit plants mutagenized by EMS; **2**. Normal plants.

图 3 红阳猕猴桃抗性突变

Fig. 3 Resistance mutation of Hongyang kiwifruit

表 2 诱变耐寒处理统计

Table 2 Statistics of cold tolerance treatment

序号 Number	新生芽数（个） Number of new shoots（pcs）
1	2
2	2
3	1
4	0
5	0
6	0

2.2 转录组测序

2.2.1 测序数据处理

为了保证能够有效保证数据分析的信息准确性和数据质量及其数据可靠性，需要对原始数据进行过滤。见表 3 共获得 43.27 G 的 Clean bases，其中六个样品的 Q_{20} 和 Q_{30} 的碱基在 Clean data 中所占的百分比均超过 94%，Clean reads 中 G 与 C 各项碱基之间的百分比均在 46%~47%之间；6 个样品均未检测到未知碱基。综合分析证明测序质量良好符合建库要求，可进行下一步分析。

表 3 样品测序数据质量评估

Table 3 Quality evaluation of sample sequencing data

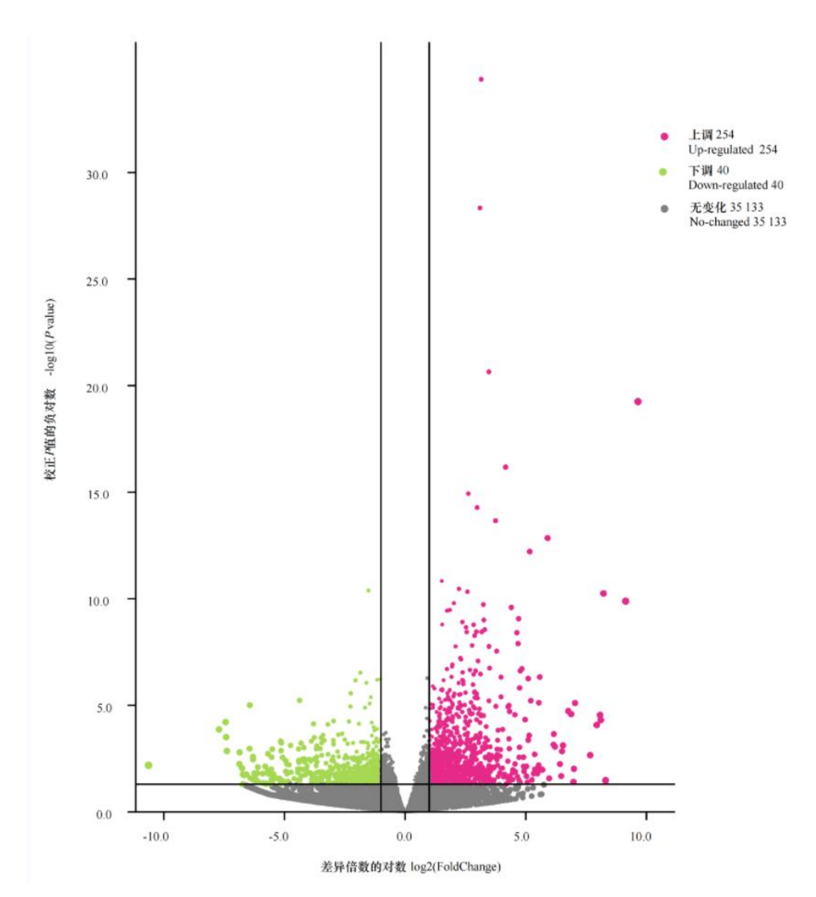
样品名称 Sample	原始数据 Raw_reads	过滤后碱基数目 Clean_bases（G）	Q_{20}（%）	Q_{30}（%）	GC 含量 GC（%）
A_1	56 845 122	8.33	99.14	94.40	46.39
A_2	51 882 920	7.62	98.27	94.65	46.05
A_3	52 140 672	7.72	98.21	94.49	46.34
B_1	43 077 866	6.26	98.18	94.52	46.10
B_2	44 489 414	6.28	98.31	94.80	46.47
B_3	47 765 538	7.06	98.23	94.57	46.30

注：**Q_{20}**. 测序碱基质量值≥20 水平的碱基数目及占 Clean reads 的百分比；**Q_{30}**. 测序碱基质量值≥30 水平的碱基数目及占 Clean reads 的百分比；**GC**. 过滤后 GC 碱基所占的比例。

Note: **Q_{20}**. Number of bases with sequencing base quality value≥20 level and the percentage of clean reads; **Q_{30}**. Number of bases with sequencing base quality value≥30 level and the percentage of clean reads; **GC**. Percentage of GC bases after filtering.

2.2.2 差异基因的筛选

同一生物在不同环境条件下其基因表达存在显著差异。如图 4 所示，结果共筛选出 294 条差异基因，其中上调差异基因为 254 条，占比为 86.4 %，下调差异基因为 40 条，占比仅有 13.65 %。由此可见，低温胁迫 12 h 内有大量的冷胁迫响应基因被成功激活，而一部分基因则受到抑制。



图中横坐标为 log2FoldChange 值（基因在处理组和对照组中的表达倍数变化）；纵坐标为-log10(*P* value)（基因在处理组和对照组中的表达差异的显著性水平）；红色圆点表示上调基因；绿色圆点表示下调基因，蓝色圆点表示无显著性差异基因。

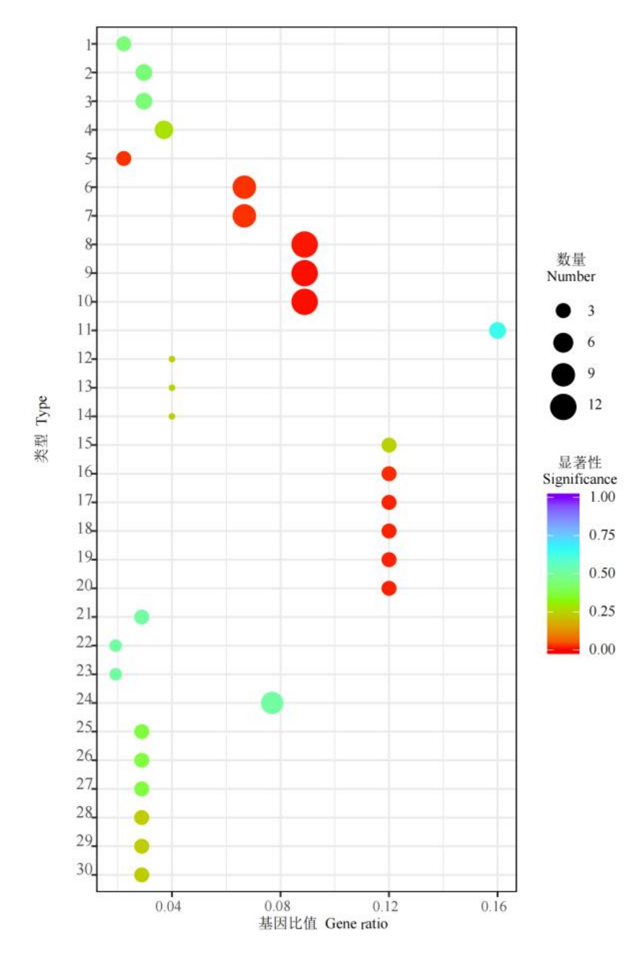
The abscissa is the log2FoldChange value (the change of gene expression multiple in the treatment group and the control group); The ordinate is -log10(*P* value) (significant level of difference in gene expression between the treatment group and the control group); The red dots represent up-regulated genes; Green dots indicate down-regulated genes and blue dots indicate genes with no significant differences.

图 4　差异基因表达结果

Fig. 4　Results of differential gene expression

2.2.3 GO 功能分析

对红阳猕猴桃处理组与对照组进行 GO 功能性的分类以及丰富性的分析。GO 功能分析主要划分为生物学过程（biological process）、分子功能（molecular function）和细胞组成（cellular component）三个方面。GO 功能富集以显著性值<0.05 作为显著性富集的阈值，结果如图 5 所示。从 GO 富集的数据分析统计结果得，生物学过程部分富集 127 个功能分类，分子功能部分为 104 个功能分类，细胞组成部分共富集 19 个功能分类，三部分中差异基因分别为 104、135、25、共 264 条。其中生物学过程部分富集功能分类最多，位于前五的富集差异基因序列条目为多细胞类生物发育（multicellular organism development）、发展过程（developmental process）、解剖学结构的发展（anatomical structure development）、胞吐作用（exocytosis）、细胞分泌作用（secretion by cell）；其次是分子功能部分，位于前五的富集差异基因序列条目为活性血红素酶的结合机理作用示例（heme binding）、四吡咯酶的结合机理作用（tetrapyrrole binding）、转移氧化酶活性作用（transferase activity）、氧化酶的还原酶活性（oxidoreductase activity）、铁离子的氧化结合机理作用（iron ion binding）；富集条目最少的是细胞组成部分。这些富集差异基因的条目均可能与红阳猕猴桃突变体耐寒性相关。



1. 丝氨酸肽链内切酶–类型活动；**2**. 丝氨酸水解酶活性；**3**. 丝氨酸–类型肽酶的活动；**4**. 碳水化合物结合；**5**. 伴侣蛋白结合；**6**. 铁离子结合；**7**. 氧化还原酶活性；**8**. 转移酶活性，转移己糖基团；**9**. 四吡咯结合；**10**. 血红素结合；**11**. 蛋白质复合体；**12**. 核膜；**13**. 核孔；**14**. 膜的固定成分；**15**. 细胞周边；**16**. 拴系综合体；**17**. 细胞质区；**18**. 细胞皮层部分；**19**. 细胞皮层；**20**. 胞外；**21**. 多细胞生物的过程；**22**. 单一–生物体发育过程；**23**. 单一–多细胞生物过程；**24**. 应激反应；**25**. 内分泌；**26**. 细胞分泌作用；**27**. 胞吐作用；**28**. 解剖学结构的发展；**29**. 发展过程；**30**. 多细胞类生物发育。

1. Serine-type endopeptidase activity; **2**. Serine hydrolase activity; **3**. Serine-type peptidase activity; **4**. Carbohydrate binding; **5**. Chaperone binding; **6**. Iron ion binding; **7**. Oxidoreductase activity; **8**. Transferase activity, transferring hexosyl groups; **9**. Tetrapyrrole binding; **10**. Heme binding; **11**. Protein complex; **12**. Nuclear envelope; **13**. Nuclear pore; **14**. Anchored component of membrane; **15**. Cell periphery; **16**. Tethering complex; **17**. Cytoplasmic region; **18**. Cell cortex part; **19**. Cell cortex; **20**. Exocyst; **21**. Multicellular organismal process; **22**. Single-organism developmental process; **23**. Single-multicellular organism process; **24**. Response to stress; **25**. Secretion; **26**. Secretion by cell; **27**. Exocytosis; **28**. Anatomical structure development; **29**. Developmental process; **30**. Multicellular organism development.

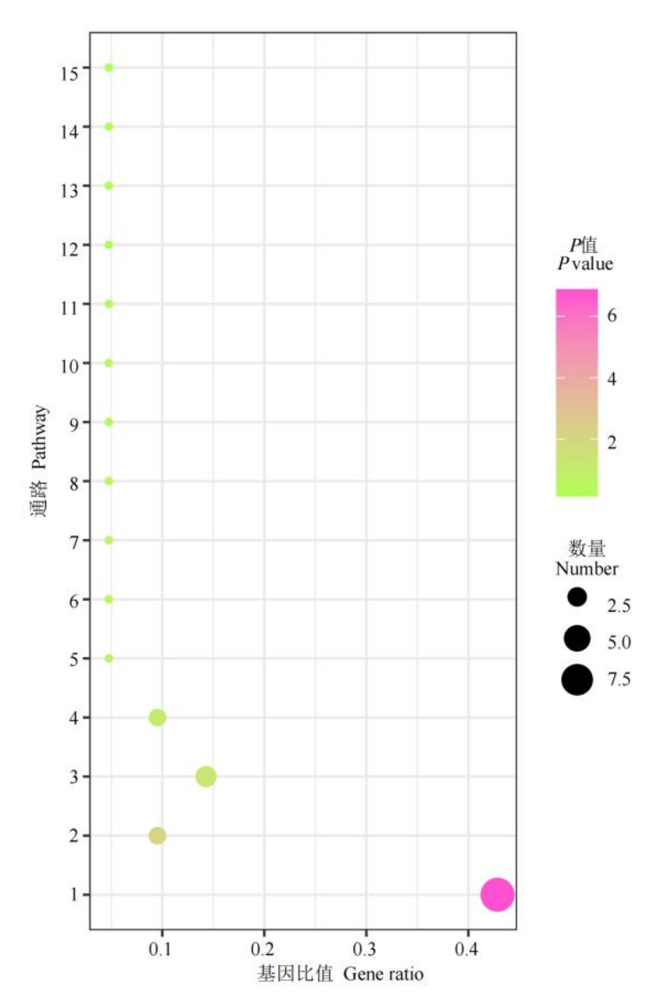
图 5 GO 富集图

Fig. 5 GO enrichment dot graph

2.2.4 差异表达基因 PATHWAY 功能分析

进行 KEGG（Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes）生物通路分类及富集分析可以确定差异表达基因主要参与的信号传导及生化代谢途径。该研究以 P<0.05 作为显著性富集的阈值，利用 KEGG 数据库对红阳猕猴桃两个处理组合中的差异基因进行生物通路分析，结果见图 6。21 条差异基因在 KEGG 通路中得到注释，共富集到 15 条通路中，且都为上调差异基因。其中呈极显著富集（P＜0.01）的通路是内质网中的蛋白质加工（protein processing in endoplasmic reticulum）共富集 9 条差异基因；呈显著富集（P＜0.05）的通路是硫代谢（sulfur metabolism）和激素信号转导（plant hormone signal transduction）两个通路，分别富集 2 个和 3 个差异基因；其次，MAPK 信号通路–植物（MAPK signaling pathway - plant）共富集 2 条差异基因；富集只有一个差异基因的通路为色氨酸代谢（tryptophan metabolism）、2–氧代羧酸代谢（2 -Oxocarboxylic acid metabolism）、甘油酯代谢（glycerolipid metabolism）、

半胱氨酸和甲硫氨酸代谢（cysteine and methionine metabolism）、RNA 降解（RNA degradation）、mRNA 监控途径（mRNA surveillance pathway）、胞吞作用（endocytosis）、RNA 转运（RNA transport）、剪接体（spliceosome）、碳代谢（carbon metabolism）和氨基酸的生物合成（biosynthesis of amino acids）通路。由于内质网中的蛋白质加工通路呈极显著富集，推测其富集的差异基因与耐寒性相关性较高。



1. 内质网中的蛋白质加工；**2**. 硫代谢；**3**. 植物激素信号转导；**4**. MAPK 信号传导途径—植物；**5**. 色氨酸代谢；**6**. 2-氧代羧酸代谢；**7**. 甘油脂代谢；**8**. 半胱氨酸和甲硫氨酸代谢；**9**. RNA 降解；**10**. mRNA 监测途径；**11**. 胞吞作用；**12**. RNA 转运；**13**. 剪接体；**14**. 碳代谢；**15**. 氨基酸的生物合成。

1. Protein processing in endoplasmic reticulum; **2**. Sulfur metabolism; **3**. Plant hormone signal transduction; **4**. MAPK signaling pathway - plant; **5**. Tryptophan metabolism; **6**. 2-Oxocarboxylic acid metabolism; **7**. Glycerolipid metabolism; **8**. Cysteine and methionine metabolism; **9**. RNA degradation; **10**. mRNA surveillance pathway; **11**. Endocytosis; **12**. RNA transport; **13**. Spliceosome; **14**. Carbon metabolism; **15**. Biosynthesis of amino acids.

图 6 KEGG 富集图

Fig. 6 KEGG enrichment dot graph

2.2.5 内质网中的蛋白质加工通路分析

在红阳猕猴桃突变体与对照组应答冷胁迫中，内质网蛋白质加工通路中差异基因富集最多，这 9 条差异基因全部富集在内质网相关降解(endoplasmic reticulum associated degradation, ERAD)过程中，且均为上调表达。通路富集差异基因表达量见表 4，其中与植物温度胁迫相关的热激转录因子（*small Heat Shock Factor*，*sHSF*）富集了 7 条差异基因，其表达量最高增加了 25.65 倍，显著高于未诱导耐寒突变体的对照组（$P<0.05$）；与蛋白质聚合有关的热激蛋白 70B（heat shock protein 70，Hsp70）富集了 1 条差异基因，其表达量高于未诱导处理 3.8 倍，差异达显著水平（$P<0.05$）；Hsp70 互作蛋白（NEF）富集了 1 条差异基因，其表达量高于未诱导处理 1.86 倍，差异达显著水平（$P<0.05$）。

表 4 与内质网中的蛋白质加工相关的差异基因表达量

Table 4 Expression of DEGs associated with protein processing in the endoplasmic reticulum

处理组 Treatment group	差异基因表达量 Expression of DEGs		
	sHSF	*Hsp*70	*NEF*
A	10.11±4.72 b	59.42±14.57 b	18.12±1.66 b
B	259.29±33.36 a	225.54±22.76 a	33.73±0.92 a

注：表中数值使用平均值±标准误差表示；同一列不同小写字母表示差异显著（P<0.05）。
Note: Values in the table are expressed using the mean ± standard error; Different lowercase letters in the same column indicate significant differences (P<0.05).

3 讨论

由于温室气体排放等原因，近年地球气候变化加剧，植物受到高温、低温胁迫的情形更加普遍。低温胁迫通常会致使植物细胞酶活性的降低、膜系统的破坏和细胞的失水等，进而导致其细胞代谢紊乱，甚至是细胞死亡，对作物的产量乃至其生存造成重大影响。因此，选育抗寒或耐寒品种及进行耐寒机理研究成了当今研究的热点（孙慧，2019；胡松梅等，2019；周鹤莹，2020）。近年来在选育优良品种的过程中，使用植物组织培养与诱变技术相结合的离体诱变技术开始逐渐受到人们的关注（王小华等，2010；陈祥韦，2017；胡松梅等，2019）。该研究利用 EMS 诱变剂处理红阳猕猴桃愈伤组织，的确发现 EMS 诱变剂处理可加大植物变异范围，丰富种质资源，通过筛选也获得了耐寒突变体，这与前人的研究结果是一致的（陈祥韦，2017；孙慧，2019）。

此外，该研究对红阳猕猴桃愈伤组织进行不同浓度梯度的 EMS 诱变时，观察到部分突变体的生长能力比对照组弱，主要表现在株高较矮、叶片发黄等方面。这可能是由于 EMS 是非定向诱变剂所致。突变可分为有害突变、有利突变和中性突变，该研究中观察到部分突变体的生长能力变弱，应是有害突变。该研究将 EMS 诱变的红阳猕猴桃植株与未经诱变植株进行寒胁迫处理，结果表明 EMS 诱变的部分红阳猕猴桃植株叶片有新芽长出，而对照植株全部枯萎死亡；说明部分经 EMS 诱变的红阳猕猴桃突变植株具有一定的抗寒性，这应是有利突变。这也进一步证实了 EMS 诱导的突变是不定向的，有可能导致有害突变，也可以导致有利突变，要得到有用的突变，关键在于筛选。

当植物在遭受寒冷胁迫时，低温会促进细胞内活性氧的产生，同时生物大分子也会受到破坏（张健等，2020）。如在内质网（ER）中，蛋白质可以通过内腔伴侣发生折叠，正确折叠后，蛋白质经过包装后进入运输小泡，然后运输到高尔基体中，而在胁迫下发生错误折叠后，蛋白质和分子伴侣作用使之在 ER 腔内保留下来（Meusser et al., 2005；阎隽和王莹莹，2014；李瑞，2015）。随后内质网膜上的“分子伴侣”重链结合蛋白（Bip）和错误折叠后的蛋白质相结合，并在 ERAD 过程中的蛋白酶体发生降解（Mccracken & Brodsky, 2010）。在该研究的内质网加工通路中，猕猴桃植株在受到冷胁迫后，差异基因在 ERAD 过程呈上调状态，则可能该植物分解末端错误折叠的蛋白质功能增强，压力扰乱蛋白质折叠，从而导致错误折叠或聚集蛋白质的超积累，这种被破坏的蛋白质沉积导致损害细胞组成的蛋白毒性应激，因此生物体必须重新折叠或移除错误折叠的蛋白质才能维持健康生长（Izumi, 2019）。已知，*sHSF* 最初是在高温响应中被发现的，参与应激反应和“记忆”，但是，现在普遍认为它们也参与低温响应（Stief et al., 2014）。根据张宁等（2019）通过对比过表达小热激蛋白的番茄（*Lycopersicon esculentum*）植株和正常植株，发现小热激蛋白能够积极地调动起来以对抗逆境胁迫，达到提高番茄耐寒性的目的。史洁玮等（2020）发现低温胁迫下，诱导番茄小热激蛋白基因 *CI-HSP*17.7 含量上升，并通过糖含量的变化使番茄果实的耐寒性增强。Waters 等（1996）证实了寒胁迫能诱导植物 *Hsp*70 的 mRNA 与蛋白质的合成。以及，宫伟娜等（2009）发现紫茎泽兰（*Ageratina adenophora*）在冷胁迫下，不同分子量热激蛋白基因通过保护功能蛋白的活性进而增强紫茎泽兰的低温适应能力。同时，在水稻(*Oryza sativa*)的相关研究中发现，冷胁迫前后热激水稻幼苗的胚根可以明显提升幼苗胚根的耐寒性（Saltveit, 2001）。而 NEF 是一种 *Hsp*70 结合蛋白，通过介入体内分子伴侣体系使之具有稳定细胞质 *Hsp*70 的功能，其缺失可导致 *Hsp*70 的降解（刘霞霞等，2017）。进一步推测出，受到冷胁迫后的红阳猕猴桃耐寒突变体植株蛋白酶体降解能力加强，这可能是由于蛋白质与在胁迫下形成的热激蛋白大分子寡聚物 *sHSF* 相互作用，从而使蛋白质的进一步聚合得到抑制，并与 *Hsp*70、*NEF* 等其他分子伴侣在一定的条件下帮助蛋白重新折叠，进而维持蛋白质的正常结构和功能，从而达到增强其抗寒性的目的。结合 EMS 诱导红阳猕猴桃耐寒突

变体及转录组分析，以上研究结果为红阳猕猴桃耐寒种质资源选育及耐寒分子机制研究提供了一定的实验材料及理论参考依据。

4 结论

该研究利用 EMS 诱导出叶型和株型共 12 种突变体，最终通过寒胁迫处理筛选出耐寒突变体。进一步将初步筛选出的耐寒突变体与正常红阳猕猴桃植株进行转录组技术分析，结果表明，进行寒胁迫处理的红阳猕猴桃耐寒突变体与对照组红阳猕猴桃正常植株相比，共有差异基因 294 条，其中上调表达 254 条，下调表达 40 条。差异基因注释到 250 个 GO 功能分类和 15 条 KEGG 通路中，分析结果显示，内质网中蛋白质加工通道呈极显著富集了 9 条差异基因，且均为上调表达，发现了 3 类耐寒相关基因，通过分析推测出红阳猕猴桃通过提升 *sHSF*、*Hsp*70、*NEF* 的表达量来提升其耐寒性。

参考文献：

CHEN XW, 2017. Obtaining cold-tolerant mutants of Puffin tares using EMS mutagenesis [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University. [陈祥韦，2017. 利用 EMS 诱变技术获得海雀稗耐寒突变体[D]. 南京：南京农业大学.]

GONG WN, 2009. The role of heat stress protein genes in the invasive plant *Zingiber officinale* during low temperature stress [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences. [宫伟娜，2009. 低温胁迫过程中入侵植物紫茎泽兰热激蛋白基因的作用[D]. 北京：中国农业科学院.]

HU SM, ZHOU YS, KANG HY,2019. Mutagenesis screening of cold-tolerant mutants in *Dendrobium ferruginum* by diethyl sulfate[J]. Jiangxi Agric, (18): 114-115. [胡松梅，周永胜，康和英，2019. 硫酸二乙酯诱变筛选铁皮石斛耐寒突变体的研究[J]. 江西农业，(18)：114-115.]

HUANG YH, SHI XZ, LI GY, et al., 2016. Investigation and analysis of freezing damage to kiwifruit at the southern foot of Taishan in 2016 [J]. Deciduous Fruits, 48(6): 17-19. [黄永红，史修柱，李桂云，等，2016. 2016 年泰山南麓猕猴桃冻害调查与分析[J]. 落叶果树，48(6)：17-19.]

IZUMI M, 2019. Heat shock proteins support refolding and shredding of misfolded proteins[J]. Plant Physiol, 180(4): 1777-1778.

LI HL, WANG JH, ZHANG WM, et al., 2021. Frost damage indicators of fruiting mother branches of the dominant variety kiwifruit under simulated low temperature [J]. J Appl Meteorol Climatol, 32(5): 618-628. [李化龙，王景红，张维敏，等，2021. 模拟低温下主产品种猕猴桃结果母枝冻害指标[J]. 应用气象学报，32(5)：618-628.]

LI R, 2015. The regulatory role of Arabidopsis GAAP1 on endoplasmic reticulum stress [D]. Shanghai: East China Normal University. [李瑞，2015. 拟南芥 GAAP1 对内质网胁迫的调控作用[D]. 上海：华东师范大学.]

LI W, 1996. Study on the mechanism of cold resistance of citrus protoplasts and the screening and culture of cold-resistant protoplasts [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University. [李卫，1996. 柑桔原生质体抗寒机理及抗寒原生质体筛选培养的研究[D]. 武汉：华中农业大学.]

LIU FX, 2018. Polyploidy induction and cold resistance mutant screening in Xinjiang Kulle balsam pear [D]. Xianyang: Northwest University of Agriculture and Forestry Science and Technology. [刘凤霞，2018. 新疆库尔勒香梨多倍体诱导和抗寒突变体筛选[D]. 咸阳：西北农林科技大学.]

LIU XX, YANG Y, FU C, et al., 2017. C-terminal is an essential functional domain of plant *Fes1* protein [J]. J Univ Jinan (Sci Nat Ed), 31(4): 304-310.[刘霞霞，杨颖，付灿，等，2017. C 末端是植物 *Fes1* 蛋白的必需功能域[J]. 济南大学学报(自然科学版)，31(4)：304-310.]

MA QS, 2014. Effect of temperature pretreatment on postharvest 'Hongyang' kiwifruit fruit cold damage and its cold-induced transcription factor CBF expression[D]. Xianyang: Northwest Agriculture and Forestry University of Science and Technology. [马秋诗，2014. 温度预处理对采后'红阳'猕猴桃果实冷害及其冷诱导转录因子 CBF 表达的影响[D]. 咸阳：西北农林科技大学.]

MEUSSER B, HIRSCH C, JAROSCH E, et al., 2005. ERAD: the long road to destruction[J]. Nat

Cell Biol, 7(8): 766-772.
MCCRACKEN AA, BRODSKY JL, 2010. Evolving questions and paradigm shifts in endoplasmic-reticulum-associated degradation (ERAD)[J]. Bioessays, 25(9): 868-877.
PENG B, XU QG, LI HL, et al., 2007. Advances in crop chemical mutagenesis breeding research[J]. Crop Res, 21(B12): 517-519. [彭波，徐庆国，李海林，等，2007. 农作物化学诱变育种研究进展[J]. 作物研究，21(B12)：517-519.]
SALTVEIT ME, 2001. Chilling injury is reduced in cucumber and rice seedlings and in tomato pericarp discs by heat-shocks applied after chilling[J]. Postharvest Biol Technol, 21(2): 169-177.
SHI JW, 2020. Functional study of *CI-HSP*17.7 in tomato under low temperature stress [D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University. [史洁玮，2020. 低温胁迫下番茄中 *CI-HSP*17.7 的功能研究[D]. 沈阳：沈阳农业大学.]
SHI WY, XU HD, WEI ZH, et al., 2021. Leaf induction into seedling expansion technology of 'Xu Xiang' kiwifruit [J]. N Horticul, 24: 16-22. [师万源，徐红达，魏卓，等，2021. '徐香'猕猴桃叶片诱导成苗扩繁技术[J]. 北方园艺，24：16-22.]
SONG Y, 1994. The new star of cold-resistant large-fruited peaches in northern China-Blood Cold No. 1 peach [J]. Beijing Agric, (3): 5. [宋扬，1994. 北国抗寒大果桃的新星–血寒 1 号桃[J]. 北京农业，(3)：5.]
STIEF A, ALTMANN S, HOFFMANN K, et al., 2014. Arabidopsis miR156 regulates tolerance to recurring environmental stress through SPL transcription factors [J]. Plant Cell, 26: 1792-1807.
SUN H, 2019. Preliminary study on EMS mutagenesis of seaside hibiscus and screening of cold-resistant mutants [D]. Jinan: Shandong Normal University.[孙慧，2019. EMS 诱变海滨木槿及抗寒突变体筛选的初步研究[D]. 济南：山东师范大学.]
WANG XH, ZHUANG NS, WANG Y, et al., 2010. Combination of DES mutagenesis and *in vitro* culture for screening of cold-resistant mutants in columnaris [J]. Acta Pratac Sin, 19(1): 263-267. [王小华，庄南生，王英，等，2010. DES 诱变与离体培养结合筛选柱花草抗寒突变体的研究[J]. 草业学报，19(1)：263-267.]
WANG YD, ZHAO JR, GUO JL, et al. 1999. Application of mutagenesis breeding in creating new maize germplasm [J]. Beijing Agric Sci, 17(2): 12-16. [王元东，赵久然，郭景伦，等，1999. 诱变育种在创造玉米新种质中的应用[J]. 北京农业科学，17(2)：12-16.]
WATERS ER, LEE GJ, VIERLING E, 1996. Evolution, structure and function of the small heat shock proteins in plants[J]. J Exp Bot, 47(3): 325-338.
YAN J, WANG YY, 2014. Degradation of endoplasmic reticulum-related proteins and mechanisms [J]. Chin Foreign Food Ind(Second Half), (8): 87.[阎隽，王莹莹，2014. 内质网相关蛋白的降解及机制[J]. 中外食品工业(下半月)，(8): 87.]
YANG N, 2020. Analysis of EMS mutagenic dwarf mutants of 'Heinz 1706' tomato [D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University. [杨宁，2020. 'Heinz 1706'番茄 EMS 诱变矮化突变体分析[D]. 沈阳：沈阳农业大学.]
ZHANG J, TANG L, RAN QF, et al., 2020. Advances in transcriptome sequencing of plants in response to low temperature stress [J]. Mol Plant Breed, 18(6): 1849-1866. [张健，唐露，冉启凡，等，2020. 植物响应低温胁迫转录组测序研究进展[J]. 分子植物育种，18(6)：1849-1866.]
ZHANG N, 2019. Functional analysis of small heat stress protein SlHSP17.7 in tomato fruits in response to low temperature stress [D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University. [张宁，2019. 小热激蛋白 SlHSP17.7 在番茄果实响应低温胁迫中的功能分析[D]. 沈阳：沈阳农业大学.]
ZHANG W, FU FH, LUO SN, et al., 2021. Quality evaluation and comprehensive analysis of Hunan red heart kiwifruit varieties[J]. Food Ferment Ind, 47(5): 201-210. [张维，付复华，罗赛男，等，2021. 湖南红心猕猴桃品种品质评价及综合分析[J]. 食品与发酵工业，47(5)：201-210.]
ZHOU HY, 2020. Transcriptome analysis of jujube freezing stress and functional study of related genes[D]. Beijing: Beijing Forestry University. [周鹤莹，2020. 枣冷冻胁迫转录组分析及相关基因的功能研究[D]. 北京：北京林业大学.]